

PCR tiempo real para detección de *Hepatozoon canis* en perros de la ciudad de Cúcuta, Colombia

Real time PCR for detection of *Hepatozoon canis* in dogs from the city of Cúcuta, Colombia

Danny Chinchilla¹, Richard Thomas^{1,2}, Lyda R. Castro¹

RESUMEN

Hepatozoon canis son protozoarios transmitidos a perros principalmente por garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus*. En Colombia se ha detectado *H. canis*; sin embargo, solo se dispone de un estudio empleando la técnica de PCR para la detección de este hemoparásito. En este trabajo se reporta una frecuencia de infección de 8.6% (30/350 muestras). Se detectó la presencia de *H. canis* en muestras de sangre de caninos domésticos de la ciudad de Cúcuta (Colombia), mediante PCR en tiempo real, empleando la tecnología de sondas de hibridación con detección dúplex y control interno de amplificación GADPH, utilizando cebadores y sondas diseñados en el presente estudio.

Palabras clave: Apicomplexa, caninos, detección molecular, hemoparásito

ABSTRACT

Hepatozoon canis are protozoa transmitted to dogs mainly by ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* species. In Colombia, *H. canis* has been detected; however, only one study using the PCR technique is available detecting this hemoparasite. This study reports a frequency of infection of 8.6% (30/350 samples). *H. canis* was detected in blood samples from domestic dogs in the city of Cúcuta (Colombia), by real-time PCR using hybridization probes with duplex detection and internal control of GADPH amplification, using primers and probes designed in this study.

Key words: Apicomplexa, canines, molecular detection, hemoparasites

¹ Grupo de Investigación en Evolución, Sistemática y Ecología Molecular (GIESEMOL), Universidad del Magdalena, Santa Marta (Magdalena), Colombia

² E-mail richardthomassh@gmail.com

Recibido: 9 de julio de 2019

Aceptado para publicación: 20 de junio de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

INTRODUCCIÓN

Hepatozoon canis es un protozoario apicomplejo de la clase Conoidasida (Cavalier-Smith, 2003; Adl *et al.*, 2005). Este hemoparásito es transmitido por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, la cual parasita comúnmente a cánidos (Baneth *et al.*, 2007). Otras garrapatas como *Amblyomma ovale*, *Haemaphysalis flava*, *Haemaphysalis longicornis*, *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus turanicus* también han sido descritas como vectores de *H. canis* (Murata *et al.*, 1995; de Miranda *et al.*, 2011; Giannelli *et al.*, 2017; Kwon *et al.*, 2017).

La transmisión de *H. canis* ocurre por la ingesta de oocistos maduros contenidos en alguno de sus vectores (Baneth *et al.*, 2007), y mediante la transmisión intrauterina (Murata *et al.*, 1993). La hepatozoonosis puede causar manifestaciones clínicas severas en los perros (anorexia, fiebre, letargia y linfadenomegalia) (Otranto *et al.*, 2011).

H. canis se ha reportado en África (Harris *et al.*, 2017), Asia (Kwon *et al.*, 2017), Europa (Ebani *et al.*, 2015) y Oceanía (Greay *et al.*, 2018). En Sudamérica se ha documentado ampliamente en perros de áreas rurales y urbanas (Rey-Valeiron *et al.*, 2012; Da Silva *et al.*, 2016; Vezzani *et al.*, 2017). En Colombia fue reportada en 2012 empleando técnicas moleculares (Vargas-Hernandez *et al.*, 2012), aunque existen otros reportes por frotis sanguíneo (Arcila *et al.*, 2005; Ardila *et al.*, 2007; Acevedo *et al.*, 2009; Castellanos, 2009; Correa, 2013; Cala *et al.*, 2018).

Dentro de las técnicas empleadas para el diagnóstico se encuentran el extendido de sangre periférica, así como pruebas serológicas e histopatológicas; además de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que presenta mayor especificidad y sensibilidad para el diagnóstico definitivo (Oyamada *et al.*, 2005). El propósito del presente trabajo fue la evaluación y aplicación de una PCR

en tiempo real empleando la tecnología de sondas de hibridación con detección dúplex y control interno de amplificación GADPH para la detección de *H. canis* en perros de la ciudad de Cúcuta (Colombia).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Entre mayo y junio de 2016 se recolectaron 350 muestras de sangre de perros que fueron llevados a consulta a clínicas veterinarias de la ciudad de Cúcuta (Colombia) con sospecha clínica de hemoparasitosis. Se tomó 1 ml de sangre con EDTA de los pacientes con previa autorización de sus propietarios. La muestra fue distribuida en dos alícuotas de 500 µl en viales de 1.5 ml (SSI, USA) y almacenadas a -20 °C para la extracción de ADN en las 72 horas siguientes a la recolecta.

Cebadores para PCR Tiempo Real

Se utilizaron secuencias del gen 18S rRNA para *H. canis* (AF176835.1, LC331055.1, HQ829448.1, KP715303.1, FJ497022.1, KJ605145.1, KY965141.1) y secuencias para el gen GADHP (AB038241.1, NM_001003142.2) disponibles en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias recuperadas se alinearon para generar secuencias consenso, con base a las cuales se diseñaron los cebadores y sondas empleando el programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (Untergasser *et al.*, 2007).

Extracción de ADN y Amplificación de Genes

Se utilizó la técnica de *Salting out* modificada. Se tomó 200 µl de sangre y se agregó 1000 µl de ddH₂O, se centrifugó a 13 400 x g durante 2 min y se descartó el sobrenadante. Se agregó 500 µl de buffer de lisis de glóbulos rojos (10 mM Tris [Biobasic, USA]- HCl pH 8.0, Triton al 1% [VWR

Cuadro 1. Cebadores y sondas desarrolladas para la detección de *Hepatozoon canis*

Cebador / Sonda	Secuencia 5'-3'	Tamaño del fragmento
HEPAFW	AGCAATGATGTCCTTTGAAGTG	192pb
HEPARV	CCCAACTGTCCCTATCAATCA	
Hep-Sonda	FAM-AGAGTGTTTCTAGCAGGCCAACGCTT- BHQ1	
GADPf	AAGGCTGAGAACGGGAAACT	101pb
GADPr	TACTCAGCACCAGCATCACC	
GADPS	HEX-CGAGATCCCGCCAACATCAAATG-BHQ1	

Amresco], sacarosa al 11% [Carlo Erba]), se agitó en el vórtex (fuerte) y se centrifugó a 13400 x g durante 2 min, descartándose el sobrenadante y se repitió este paso una vez más. Luego se agregó 500 µl de ddH₂O, se centrifugó a 13 400 x g durante 2 min, descartándose el sobrenadante. Seguidamente, se agregó 180 µl de buffer de lisis de glóbulos blancos al sedimento (10 mM Tris – HCl pH 8.0, 400 mM NaCl [Emsure Merck], 2 mM EDTA p VWR Amresco)), más 10 µl de SDS al 20% y 20 µl de proteinasa K (1 mg/ml proteinasa K [Thermo Fischer], 1% SDS, EDTA 2 mM). Se incubó a 37 °C durante 1 h (vórtex cada 15 min).

Las proteínas se precipitaron con 90 µl de 5M NaCl centrifugándose a 13 400 x g durante 5 min. Luego se agregó 20 µl de 5M NaCl al sobrenadante y se centrifugó a 13400 x g durante 5 min. Al sobrenadante se le agregó 300 µl de alcohol al 99% y se centrifugó a 16 700 x g durante 5 min. Seguidamente se realizaron dos lavados con 300 µl de alcohol al 70%. Las muestras se hidrataron con 150 µl de ddH₂O para su posterior cuantificación con el Biofotómetro de Eppendorf Plus (Eppendorf, Alemania).

Las reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real se realizaron en un termociclador Rotor-Gene Q 2PLEX HRM de Qiagen empleando los cebadores y sondas diseñadas en este trabajo (Cuadro 1) en un volumen final de 12 µl, constituido por el master mix *Quantinova probe* de Qiagen, 400 µM por cebador, 200 µM de sonda y 90 ng de DNA. Para cada PCR en tiempo real se usaron controles positivos de *H. canis*, controles negativos (pacientes sanos) y un control interno de amplificación del gen GADPH.

Las condiciones de amplificación se establecieron en 95 °C durante 5 min (activación), seguido de 30 ciclos a 95 °C durante 10 s (desnaturalización) y 60 °C durante 30 s (anillamiento - extensión). La fluorescencia se midió en cada ciclo de anillamiento – extensión. Las reacciones fueron evaluadas con el software Rotor-Gene Q v. 2.3, considerándose como positivas aquellas donde la cantidad de fluorescencia excedía el valor del umbral (*threshold*) (emisión basal de 0.05 delta florescence) y seguido de la curva en forma sigmoide.

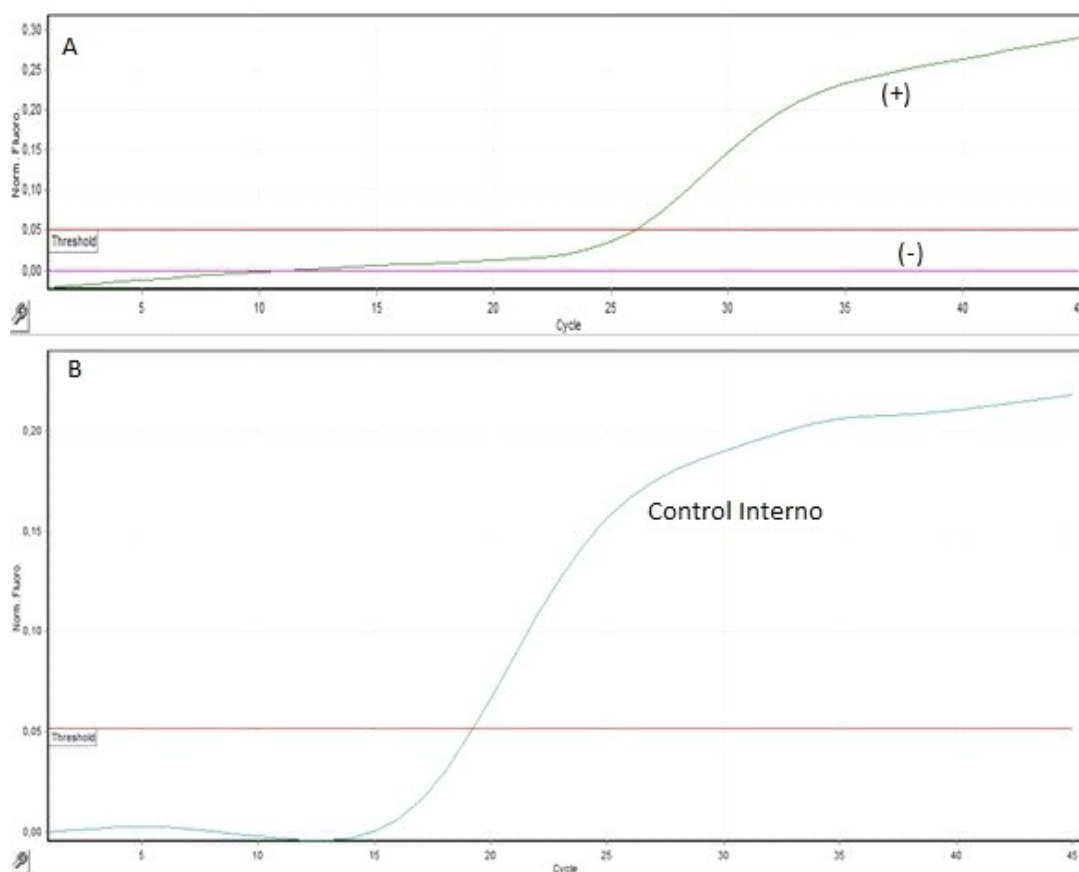


Figura 1. Valores del ciclo umbral (Cq) del control positivo y negativo para *Hepatozoon canis* y del control interno. El control positivo con un Cq de 26.47 y el control negativo que no supera el umbral, mientras que el Cq del control interno fue de 16.98

RESULTADOS

Los cebadores fueron diseñados para generar fragmentos conservados de 192 pb (control positivo -18S rRNA) y 101 pb (control interno GADPH) (Cuadro 1). El tamaño de los fragmentos se verificó mediante geles de electroforesis teñidos con RedGel y visualizados bajo luz ultravioleta. El ciclo umbral (Cq) para el control positivo fue de 26.47 y para el control interno GADPH fue de 16.98 (Figura 1).

La muestra positiva secuenciada por Macrogen Inc. (Corea) con los cebadores HEPAFW y HEPARV arrojó en el BLAST® un 99% de identidad con la secuencia MG758124.1 de *Hepatozoon canis* y verificó el tamaño de 192 pb. Por otro lado, el control interno GADPH de 101pb presentó un 96% de similitud con la secuencia XM_025438124.1 de *Canis lupus familiaris*.

Un total de 30/350 (8.6%) muestras de caninos pacientes de las clínicas veterinarias atendidos con sospecha de hemoparasitosis fueron positivas para *H. canis*.

DISCUSIÓN

La documentación sobre *Hepatozoon canis* y la hepatozoonosis canina en Colombia es escasa. La primera mención del hemoparásito y su patología la realizaron Arcila *et al.* (2005), quienes hallaron gametocitos de *H. canis* en un Pitbull. Castellanos (2009) catalogó la enfermedad como emergente en Colombia basándose en reportes propios y anteriores (Arcila *et al.*, 2005; Ardila *et al.*, 2007); sin embargo, la primera caracterización molecular de *H. canis* fue realizada por Vargas-Hernandez *et al.* (2012) en perros de tres localidades del país.

Los escasos reportes existentes en el país no permiten establecer la distribución de la parasitosis y los roles epidemiológicos (Castellanos, 2009). No obstante, se relacionan con reportes de *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus* y *Amblyomma ovale* parasitando perros (Paternina *et al.*, 2009; Rivera-Páez *et al.*, 2018), además de la amplia distribución de *Rhipicephalus sanguineus* en Colombia (López, 2017), su principal especie vector (Baneth *et al.*, 2007).

El presente trabajo es el primer reporte de *Hepatozoon canis* mediante PCR en tiempo real en la ciudad de Cúcuta (Colombia) y el segundo reporte de *H. canis* después del trabajo de Cala *et al.* (2018), quienes detectaron el hemoparásito por extendido sanguíneo y PCR. El presente estudio reporta 8.6% (30/350) de casos positivos, una frecuencia baja respecto a los 29/91 perros (31.8%) positivos con *H. canis* reportada por Vargas-Hernández *et al.* (2012), aunque superior al 2.3% (14/614) de frecuencia documentada por Li *et al.* (2008). Se recomienda realizar un muestreo aleatorio de caninos, idealmente representativo de la población, con el fin de generar valores de prevalencia que se puedan comparar con otros estudios.

Por otro lado, se logró una extracción eficiente de ADN, además de la detección de *H. canis* a través de la amplificación de

un fragmento conservado de 192 pb del gen 18S rRNA, fragmento menor al amplificado con PCR en tiempo real por Li *et al.* (2008) con 198 pb para *Hepatozoon* spp y por Inokuma *et al.* (2002) con 625 pb para *H. canis*.

CONCLUSIONES

- Se logró la detección de *Hepatozoon canis* en sangre de caninos domésticos en la ciudad de Cúcuta, Colombia, mediante la técnica de PCR en tiempo real empleando sondas de hibridación con detección dúplex, tanto de *H. canis* como del control interno de amplificación GADPH.
- Se reporta una frecuencia de 8.6% (30/350) de casos positivos de pacientes atendidos en clínicas veterinarias con sospecha de hemoparasitosis.

LITERATURA CITADA

1. Acevedo SP, Ramírez M, Restrepo LG. 2009. Uveitis and glaucoma associated with *Hepatozoon canis* infection: a case report. Rev Colomb Cienc Pec 23: 485-491.
2. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, et al. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. J Eukaryot Microbiol 52: 399-451. doi: 10.1111/j.1550-7408.2005.-00053.x
3. Arcila VH, Castellanos V, Díaz S, Sánchez M. 2005. *Hepatozoon canis* en Colombia. Rev Spei Domus 1: 40-45.
4. Ardila AM, Cala FA, Vargas GH, Arcila VH, Castellanos V. 2007. Reporte de casos clínicos con *Hepatozoon canis* en el Centro Médico Quirúrgico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia. REDVET 8(5). [Internet]. Disponible en: <https://>

- www.redalyc.org/pdf/636/63612-669006.pdf
5. **Baneth G, Samish M, Shkap V. 2007.** Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicom-plexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol* 93: 283-299. doi: 10.1645/GE-494R.1
6. **Cala DL, Noguera AK, Álvarez NC, Aguinaga JY. 2018.** Primeros casos de infección canina con *Hepatozoon canis* en la ciudad de Cúcuta, Colombia. *Rev Inv Vet Perú* 29: 1562-1570. doi: 10.15381/rivep.v29i4.15345
7. **Castellanos V. 2009.** Hepatozoonosis canina, enfermedad emergente en Colombia. *Rev Spei Domus* 4: 7-9.
8. **Cavalier-Smith T. 2003.** Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *Eur J Protistol* 39: 338-348. doi: 10.1078/0932-4739-00002
9. **Correa Restrepo C. 2013.** La ayuda diagnóstica es importante: caso de *Hepatozoon* spp. *Biosalud* 12: 121-126.
10. **Da Silva VCL, De Lima ER, De Melo MB, Fukahori FLP, De Azevedo MS, Júnior JWP, De Cássia P, et al. 2016.** Parasitological and molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs of Recife, Pernambuco and evaluation of risk factors associated. *Semin-Cienc Agrar* 37: 163-172. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n1p163
11. **de Miranda RL, de Castro JR, Olegário MMM, Beletti ME, Mundim AV, O'Dwyer LH, Eyal O, et al. 2011.** Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. *Vet Parasitol* 177: 392-396. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.044
12. **Ebani VV, Nardoni S, Fognani G, Mugnaini L, Bertelloni F, Rocchigiani G, Papini RA, et al. 2015.** Molecular detection of vector-borne bacteria and protozoa in healthy hunting dogs from central Italy. *Asian Pac J Trop Biomed* 5: 108-112. doi: 10.1016/S2221-1691(15)-30153-2
13. **Giannelli RP, Annoscia G, Buonavoglia C, Lorusso E, Dantas-Torres F, Baneth G, et al. 2017.** *Rhipicephalus turanicus*, a new vector of *Hepatozoon canis*. *Parasitology* 144: 730-737. doi: 10.1017/S0031182016-00250X
14. **Greay TL, Barbosa AD, Rees RL, Paparini A, Ryan UM, Oskam CL, Irwin PJ. 2018.** An Australian dog diagnosed with an exotic tick-borne infection: should Australia still be considered free from *Hepatozoon canis*? *Int J Parasitol* 48: 805-815. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.05.002
15. **Harris DJ, Pereira A, Halajian A, Luus-Powell WJ, Kunutu KD. 2017.** Screening for *Hepatozoon* parasites in gerbils and potential predators in South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 88: 1339. doi: 10.4102/jsava.v88i0.1339
16. **Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishi T. 2002.** Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Vet Parasitol* 106: 265-271. doi: 10.1016/S0304-4017(02)00065-1
17. **Kwon SJ, Kim YH, Oh HH, Choi US. 2017.** First case of canine infection with *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 55: 561-564. doi: 10.3347/kjp.2017.55.5.561
18. **Li Y, Wang C, Allen KE, Little SE, Ahluwalia SK, Gao D, Macintire DK, et al. 2008.** Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp infection by quantitative PCR. *Vet Parasitol* 157: 50-58. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.06.027
19. **López G. 2017.** Garrapatas (acarixodidae y argasidae) de importancia médica y veterinaria, procedentes de Norte, Centro y Suramérica. Medellín: Univ. de Antioquia. 110 p.
20. **Murata T, Inoue M, Tateyama S, Taura Y, Nakama S. 1993.** Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *J Vet Med Sci* 55: 867-868. doi: 10.1292/jvms.55.867

21. **Murata T, Inoue M, Taura Y, Nakama S, Abe H, Fujisaki K. 1995.** Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. *J Vet Med Sci* 57: 111-112. doi: 10.1292/jvms.57.111
22. **Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Stanneck D, Decaprarriis D, Capelli G, et al. 2011.** Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasite Vectors* 4: 2-7. doi: 10.1186/1756-3305-4-55
23. **Oyamada M, Davoust B, Boni M, Dereure J, Bucheton B, Hammad A, Itamoto K, et al. 2005.** Detection of *Babesia canis* rossi, *B. canis* vogeli, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clin Vaccine Immunol* 12: 1343-1346. doi: 10.1128/CDLI.12.11.1343-1346.2005
24. **Paternina LE, Díaz-olmos Y, Paternina-Gómez M, Bejarano EE. 2009.** *Canis familiaris*, un nuevo hospedero de *Ornithodoros* (A.) *puertoricensis* fox, 1947 (Acari: Ixodida) en Colombia. *Acta Biol Colomb* 14: 153-160.
25. **Rey-Valeiron C, Trujillo-Silva L, Martinez AC, Ortiz G, Sambrano G. 2012.** Estimation of *Hepatozoon canis* infections by PCR in domestic dogs from La Vela de Coro, Falcon State, Venezuela. *Rev Cient-Fac Cien V* 22: 524-529.
26. **Rivera-Páez FA, Labruna MB, Martins TF, Perez JE, Castaño-Villa GJ, Ossa-López PA, Gil CA, et al. 2018.** Contributions to the knowledge of hard ticks (Acari: Ixodidae) in Colombia. *Ticks Tick-Borne Dis* 9: 57-66. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.10.008
27. **Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. 2007.** Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35: 71-74. doi: 10.1093/nar/gkm306
28. **Vargas-Hernandez G, André MR, Munhoz TD, Faria JML, Machado RZ, Tinucci-Costa M. 2012.** Molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from Colombia. *Parasitol Res* 110: 489-492. doi: 10.1007/s00436-011-2634-7
29. **Vezzani D, Scodellaro CF, Eiras DF. 2017.** Hematological and epidemiological characterization of *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol* 8: 90-93. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.02.008